动 物 学 研 究 2012，Jun. 33(3): 329−336 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03329

舟山小黄鱼线粒体 DNA D-loop 区序列变异的遗传多样性分析

郑文娟, 来育洪, 尤昕煜, 秦茜晗, 朱世华*

(宁波大学 科学技术学院, 浙江 宁波 315212)

摘要：小黄鱼(*Pseudosciaena polyactis*)为我国重要海产经济鱼类之一, 过度捕捞和环境污染等因素造成其资源日益衰退。研究小黄鱼种群遗传结构对其资源的保护及其可持续利用有十分重要的意义。该研究采用聚合酶链式反应(PCR)技术对浙江舟山附近海域小黄鱼种群 53 个个体的 mtDNA D-loop 区全序列进行扩增, 序列长度在 795~801 bp 之间, 长度差异不大。采用 Clustal X1.83、MEGA3.1、DnaSP4.0 等生物信息学软件进行遗传多样性分析, 结果显示：53 条小黄鱼线粒体 DNA D-loop 区的 T、C、A 和 G 碱基平均含量分别为 30.3%、23.1%、32.3% 和 14.3%, 排除 13 处核苷酸的插入或缺失后, 共检测到 93 处转换和颠换位点, 约占分析序列总长度的 11.6%, 其中包括 53 个单一多态位点和 40 个简约信息位点, 共确定了 52 种单倍型, 单倍型多样性(*hd*)为 0.9993, 单倍型间的平均遗传距离为 0.012, 转换/颠换平均值为 4.305, 平均核苷酸差异数(*k*)为 9.73875, 核苷酸多样性(*π*)为 0.01233, 表明舟山小黄鱼遗传多样性处于中等水平。

关键词：线粒体 DNA; D-loop 区; 小黄鱼; 遗传多样性; 舟山
中图分类号：Q349; Q953.3; Q959.483 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)03-0329-08

Genetic diversity of *Pseudosciaena polyactis* in Zhoushan based on mitochondrial DNA D-loop region sequences

ZHENG Wen-Juan, LAI Yu-Hong, YOU Xin-Yu, QIN Xi-Han, ZHU Shi-Hua*

(*College of Science & Technology*, *Ningbo University*, *Ningbo* 315212, *China*)

Abstract: *Pseudosciaena polyactis* is an economically important species of marine fish in China that is currently declining due to overexploitation, environmental pollution and related factors. Research in to the genetic structure of *Pseudosciaena polyactis* populations plays a key role in protecting and promoting sustainable utilization. We collected 53 individuals of *Pseudosciaena polyactis* from Zhoushan, Zhejiang and sequenced and amplified the mitochondrial DNA (mtDNA) D-loop region using Polymerase Chain Reactions (PCR). The sequence length of the 53 individuals ranged from 795 to 801 bp. The sequences were analyzed by Clustal X1.83, MEGA3.1 and DnaSP4.0. The results showed that the average base content of T, C, A, G was 30.3%, 23.1%, 32.3% and 14.3%, respectively and there were 93 transition or transversion sites, including 53 single nucleotide mutation sites and 40 parsimony informative sites, which accounted for 11.6% of the length of the analyzed sequences. In total, we identified 52 haplotypes and found haplotype diversity (*hd*) of 0.9993, average number of nucleotide differences were 9.73875 (*k*), and nucleotide diversity (*π*) of 0.01233. The average genetic distance of haplotypes was 0.012, and the average transition/transversion was 4.305. Based on mitochondrial DNA D-loop region sequences, these results indicate that the genetic diversity of the *Pseudosciaena polyactis* population in Zhoushan is currently at a medium level.

Key words: Mitochondrial DNA; D-loop region; *Pseudosciaena polyactis*; Genetic diversity; Zhoushan

小黄鱼(*Pseudosciaena polyactis*), 又名小鲜(浙江)、小黄瓜(福建)、黄花鱼(山东、河北和辽宁)等, 隶属于鲈形目(Perciformes)石首鱼科(Sciaenidae)黄鱼属(*Pseudosciaena Bleeker*)(Lin, 2004), 广泛分布于渤海、黄海、东海。曾与大黄鱼、带鱼、墨鱼并称为我国“四大渔业”, 是我国最重要的海洋渔业经济种类之一。20 世纪 60 年代后, 由于受过度捕捞和环境恶化等影响, 小黄鱼资源经历了严重衰退; 自

收稿日期：2011-11-15；接受日期：2012-02-21
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: zhushihua@nbu.edu.cn
第一作者简介：郑文娟, 女, 研究生, 主要从事鱼类分子遗传学

20 世纪 90 年代开始，由于产卵场禁捕和伏季休渔制度的有效实施，其产量有所恢复，但小黄鱼种群目前却呈现个体小型化、低龄化、体质量生长拐点提前等种质资源衰退问题(Lin et al, 2004)。目前国内外小黄鱼的研究主要在于渔业资源分布、生物学特性、生态习性、饵料等几个方面(Chen et al, 2004; Chen et al, 2010; Huang et al, 2010; Jin, 1996; Lin et al, 2004; Yan et al, 2006)，而对小黄鱼种质资源的系统研究甚少(Meng et al, 2003; Peng et al, 2010; Xu et al, 2005)。

线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)中的 D-loop 区，即控制区(control region, CR)为非编码区，受到选择压力较小，因此，积累了较多的突变，如碱基替换、插入、缺失，以及众多的串联重复序列等(Tang et al, 2005)，所以在种群遗传学分析中得到普遍应用(Agnèse et al, 2006; Xia et al, 2006; Yan et al, 2009)。本文通过对舟山海域的小黄鱼种群的线粒体 DNA D-loop 区全长序列的测定，来探讨其种群遗传结构，为今后长期可持续利用和保护小黄鱼资源奠定良好的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小黄鱼种群样本随机采集于舟山沈家门的 3 条渔船，试验鱼取其肌肉组织，用 95%酒精固定，运回实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增 从保存的样本中抽取 53 个样本，基因组 DNA 从保存于 95%酒精的肌肉样品中提取，采用苯酚/氯仿抽提法(Zhu et al, 2006)。用 Nanodrop 2000 测 DNA 的浓度和质量，于-20 ℃保存备用。从 GenBank 下载小黄鱼线粒体基因全长序列，用 Oligo 软件设计 D-loop 区 PCR 扩增的引物为：DLF1(5'-*TCA GAG CAC CGG TCT TGT A*-3'), DLR1(5'-*GGG AGC TAT TAG GGC ATT C*-3')。PCR 反应体系为 50 μL，其中：Buffer 缓冲液(含 Mg^{2+})5 μL, dNTPs(各 2.5 mmol/L)5 μL, Taq 酶(2 U)0.5 μL，上、下游引物(20 μmol/L)各 1 μL, 模板 DNA(约为 100 ng)1 μL，灭菌蒸馏水 36.5 μL。PCR 反应条件为：94 ℃预变性 4 min; 94 ℃变性 1 min, 55 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 1'30"，共 34 个循环；72 ℃延伸 15 min。反应设立不含 DNA 模板的空白对照，扩增产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳验证。

PCR 产物电泳割胶回收，用凝胶纯化试剂盒(上海生工)纯化，与 pUCm-T 载体(上海生工)连接，转化感受态细胞 DH5α，筛选阳性克隆子，扩大培养后提取质粒，用 M13 引物在自动测序仪(Applied Biosystems 3730，上海英俊)正反双向测序，以保证所测序列的准确性。

1.2.2 数据处理与分析 测序后的序列，对比 GenBank 中小黄鱼的线粒体 DNA 全序列，以 $tRNA^{Pro}$ 结束和 $tRNA^{Phe}$ 起点找到 D-loop 区序列的起点和终点，得到 D-loop 区序列后，使用 Clustal X1.83 软件进行对位排列，并在 SEAVIEW 程序中对序列辅以手工校正。用 MEGA3.1 计算碱基组成及应用 Kimura 双参数法计算遗传距离(Kumar et al, 1994)，并用该软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建小黄鱼各单倍型间系统发育关系树，以大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)为外类群，以 Kimura 双参数法为替代模型，系统树分支的置信度采用自展法(bootstrap analysis, BP)重复检测 1 000 次。利用 DnaSP4.0 软件统计单倍型及多态位点(S)、计算单倍型多样性(hd)，平均核苷酸差异数(k)及核苷酸多样性(π)。用 Arlequin 3.11 软件(Excoffier et al, 2005)计算 Tajima's D 和 Fu's Fs 值(1 000 次重复随机抽样重排后进行显著性检验)，并进行核苷酸不配对分布(mismatch distribution)，并获得 τ 值，来检测舟山小黄鱼种群的历史动态。群体历史扩张时间 T 用参数 $\tau=2ut$ 进行估算(Rogers & Harpending, 1992)，其中 τ 是扩张时间参数；$u=2\mu k$, μ 为变异速率，k 表示序列长度；t 表示自扩张以来所经历的代数；扩张时间 $T=t\times$代时，代时由研究对象的性成熟年龄决定(Liu et al, 2009)。本研究中，世代时间设置为 1 年(Lin et al, 2004)，控制区分化速率分别采用 3%~10%/MY (million year)(Lee et al, 1995)。基于简约法原理用 TCS(Clement et al, 2000)构建单倍型网络图(network)。

2 结 果

2.1 线粒体 DNA D-loop 区全序列特征

本实验小黄鱼种群的 mtDNA D-loop 区序列上传至 GenBank，序列号为 JQ692234~JQ692286。53 个小黄鱼个体的线粒体 DNA D-loop 区全长介于 795~801 bp 之间，碱基长度变化不大。经 MEGA3.1 软件分析，该序列的 T、C、A 和 G 碱基的平均含量分别为 30.3%、23.1%、32.3%和 14.3%,

A+T(62.6%)的含量远高于 G+C(37.4%)的含量，这个现象与其他鱼类的控制区的碱基含量相似(Zhu et al, 2007)。

2.2　种群遗传多样性分析

利用 MEGA3.1 的 Kimura 双参数法计算遗传距离，结果显示 53 个小黄鱼个体间的遗传距离为

表 1　小黄鱼 53 个个体 mtDNA D-loop 序列的多态位点

Tab. 1　Polymorphic sites of mtDNA D-loop sequences in the 53 individuals of *Pseudosciaena polyactis*

	111111111	1111111111	2222222222	2222223333	3333333445	5555555555	5666666777	7777777777	777
	11133788	9022233334	4445556779	0222333344	4556770011	2333458222	2333334668	9137788002	2334455666	779
	3436768368	3127801372	3890376081	6468256745	6596344689	7189669131	3023589369	3484657785	9017969789	056
H1	TATATCAACA	ATAATCGCCA	GTGTACTTAC	TAGTTGGGGA	ACAACTCGAT	CAAGTACTAA	TTCCTGATGC	GTTTCCTCTA	AGCGCGTGGA	AAA
H2	....	....	....	...GG.....	......T...	..G......C	....CA....	....	....	...
H3	....	....	....	........AG	........GC	C	....C.....	....	...A......	...
H4	....	....	A...G.C...	.......C..	....	C	....C.....	....	....	...
H5	....	....	A.........	....	....	..G......C	....CA....	....	....	...
H6	....	C.........	A...G.C...	.GA.......	GA..T.....	A.G......C	....C.....	....	.....A....	...
H7	....C.....	....	A.........	....	....	C	....C.....	....	....	...
H8	....	C.........	A...G.....	..A.......	.A..T...GC	A.......GC	....C.....	....	....	...
H9	....	.C..C.....	A.........	....	....	..G......C	.CT.CA....	....	G.........	...
H10	....	C.........	A..CG.C...	..A.....A.	.A.GT...GC	A.G......C	....C.....	....	....	...
H11	....	....	A.........	....	....	C	....CA....	....	.....A....	...
H12	........T.	....	A.........	....	....	C	....CA....	....A.....	....	...
H13	....	.........G	A.........	....	....	......T..C	....C.....	....A.....	....	...
H14	.......G..	....	A.........	....	....	C	....C.....	....	........T.	...
H15	....	....	A.....C...	......A...	....	C	....C.....	A.........	....	...
H16	....	C.........	A...G.....	....	.AGGT..AGC	A.G.....GC	....C.....	....	....	...
H17	....	.....T..T.	A.........	C.........	....	C	....C.....	.......A..	....	...
H18	....	....	A........T	....	....	..GA.....C	....C.....	.CA.......	....	...
H19	....	C.........	A.........	....	.A..T...GC	A........C	..T.C.....	....	....	...
H20	....	....	A.....C...	....	....	C	....CA....	A.........	....	...
H21	....	C.........	A.........	..A.......	.A.GT...GC	A.G.....GC	....C.....	......C...	....	...
H22	.......G..	........T.	A.........	..A.......	....	..G......C	.....A....	....	...A......	...
H23	....	....	A...G.....	..A.......	....	C	..T.C.....	....	....	...
H24	....	....	ACA.......	....	....	C	....C.....	....	....	...
H25	....	........T.	ACA.......	....	.A........	A.......GC	....C.....	A.........	....	...
H26	....	......A...	A.....C...	..A.......	....	C	...TC.....	.........G	...C......	...
H27	....	.C..C..A..	A.........	....	....	C	..T.CA....	....	.A........	G..
H28	....	....	A.A...C...	....	....	..G......C	C.T.C....T	.C........	.........G	...
H29	....	....	....	....	........GC	C	....C.....	....	....	...
H30	....	....	A.........	....	....	..G......C	....C.....	.......A..	....T.....	...
H31	....	....	A.......G.	....	.A......GC	A........C	..T.C.....	....	....	...
H32	....	.C..C.....	A.....C...	....	....	C	.CT.CA....	....	........T.	...
H33	.........G	........T.	A.........	....	.AG.TC....	AG..CG...C	....C.....	....	....	...
H34	....	....	A.........	..A.......	....	C	...TC.....	....	...C......	...
H35	.......G..	........T.	A.........	....	.AGGT...GC	A.G......C	....C...A.	....	....	...
H36	....	..G.....T.	A.........	....	.AGGT.....	A.G.....TC	....C.....	....	....	...
H37	....	....C.....	A.........	....	....	C	..T.C.....	....A.....	....	.G.
H38	...G......	..G.......	A.........	..A.......	....	C	...TC..C..	....	...C......	...
H39	....	.........G	A.........	....	........GC	C	....CA....	....	....	...
H40	CT........	....	A.....C...	....	....	C	....CA....	....	....	...
H41	CT........	....	A...G.....	..A.......	....	C	....CAG...	.......A..	.........G	...
H42	....	........T.	A.........	....	....	C	....C.....	........C.	....	...
H43	....	C.........	....G.....	....	.A.GT.....	A.G......C	..T.C.....	....	...A......	...
H44	..C.......	....	A...G.CC..	....	....	.......C.C	....C.....	.C........	......C...	...
H45	....	...G......	A...G.....	..A.......	....	C	....C.....	.......A..	....	...
H46	.....A....	....	....	....	....	C	....C.....	....	....	...
H47	....	C.........	A.........	..A.......	.A.GT.....	A.G.....GC	C...C.....	...C......	....	...
H48	....	....C.....	A...G.....	..A..A....	....	C	....C.....	.......A..	....	...
H49	....	....	A...G.....	..A.......	....	C	....C.....	.......A..	....	...
H50	....	........T.	A....T....	....	.AG.T.....	..G.....GC	....C.....	....	...A......	...
H51	....	....	A.........	....	....	..G......C	....CA....	....	..T.......	...
H52	......C...	....	A.....C...	....	....	..G......C	....C.....	.....A....	.......A..	..G

0.000~0.026, 平均遗传距离为 0.012, 转换/颠换平均值为 4.305。DnaSP4.0 软件分析显示, 53 个个体中共检测到 93 个多态位点, 各个多态位点见表 1, 占分析位点总数的 11.6%, 其中 53 处位点为单一多态位点, 占 6.6%; 其他 38 处均为简约信息位点, 占 4.7%; 另有 2 处简约信息位点, 即 423 nt 和 747 nt, 为三核苷酸间的变异。所有的突变位点均为两核苷酸或三核苷酸间的变异, 并未发现四核苷酸间的变异。此外, 53 个个体中共检测到 13 个插入或缺失位点, 占分析位点总数的 1.6%, 共检测出 52 个单倍型, 除了两个个体(1-18 与 2-11)间有一个共享单倍型 H15 外, 其余测定的小黄鱼个体均拥有各自的单倍型。单倍型多样性(*hd*)为 0.9993, 平均核苷酸差异数(*k*)为 9.73875, 核苷酸多样性(*π*)为 0.01233。

2.3 种群遗传结构

以邻接法(NJ)构建系统发育树, 以大黄鱼为外类群对舟山小黄鱼种群的 52 个单倍型进行系统发育分析, 枝上的数值是 1 000 次重复抽样检验的置信度值(仅显示支持率大于 50%的数据)(图 1)。图中显示, 52 个单倍型基本各成一支, 遗传距离特近的单倍型聚成一簇, 其中 1-18 和 2-11 共享单倍型 H15, 它们聚成一簇, 置信度高达 96%。网络亲缘关系图与系统发育树基本一致(图 2), 以单倍型 H5 为中心, 推测这个单倍型可能较为原始, 再以 H5 衍生出 5 分支, 每个支系内的单元型之间多为 1~5 步的突变次数, 而 2 个支系之间最高达 31 步的突变次数。

2.4 种群历史动态

根据群体碱基错配分布曲线是否呈现多峰或单峰型, 以及 Tajima's *D* 和 Fu's *Fs* 值中性检验是否显著, 判定舟山小黄鱼种群在过去是否发生了群体扩张。结果显示, 小黄鱼线粒体 DNA D-loop 区的单倍型核苷酸不配对分布曲线基本表现出明显的单峰泊松分布, 并且与群体扩张模型下的预期分布相吻合(图 3), Tajima's *D* 值为−1.84772 (*P*=0.013<0.05), Fu's *Fs*=−24.49575 (*P*=0.000<0.05), 结合三者说明舟山小黄鱼种群可能经过群体扩张。本研究中, *τ*=8.507, *k*=803, 代时取 1, 计算得到 T 值为 0.088~0.026 MY, 说明小黄鱼群体扩张时间约为更新世晚期(冰河期)。

2.5 舟山小黄鱼种群的线粒体 DNA D-loop 区各区段的遗传多样性

根据小黄鱼的线粒体 DNA D-loop 区结构(Liu et al, 2010)的区段划分, 通过序列比对, 1~178 nt 为终止序列区, 179~559 nt 为中央保守区, 560~803 nt 为保守序列区, 各个区段的遗传多样性指数见表 2,

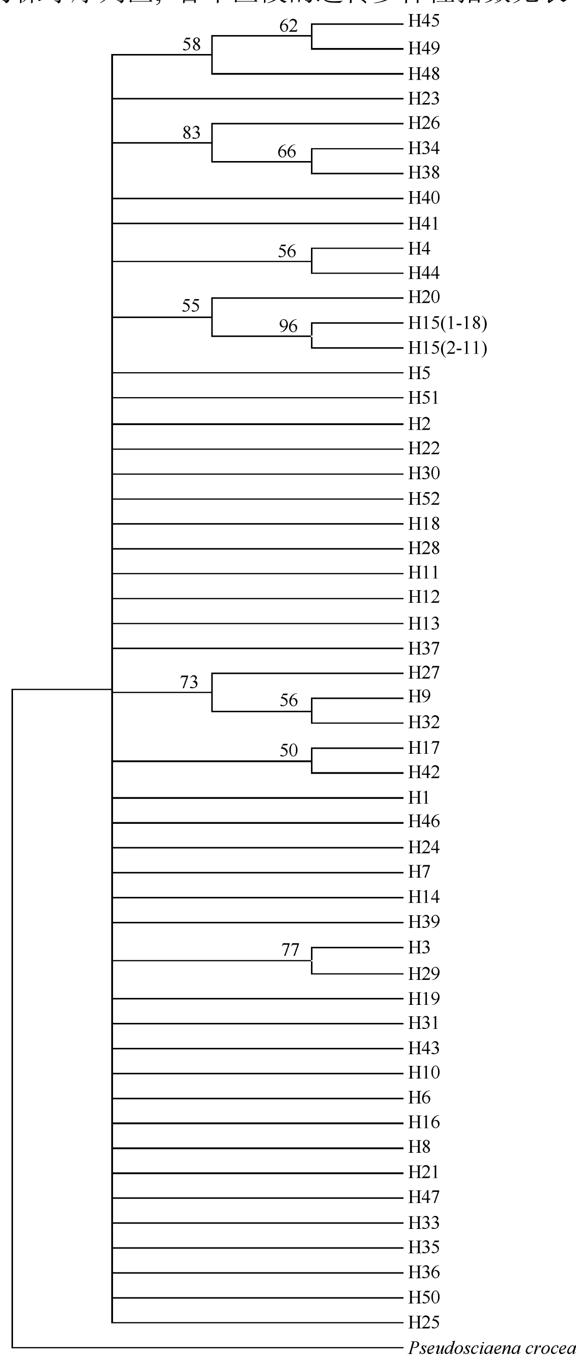


图 1 基于小黄鱼线粒体 DNA D-loop 区全序列通过邻接法构建的分子系统树

Fig. 1 Molecular phylogenetic tree on complete control region sequences of *Pseudosciaena polyactis* constructed by Neighbour-Joining method of MEGA Version 3.1 with Bootstrap Test (1 000 replications)

从表中看出小黄鱼种群中终止序列区是整个 D-loop 区变异最多的区段, 其次是中央保守区, 最保守的是保守序列区。

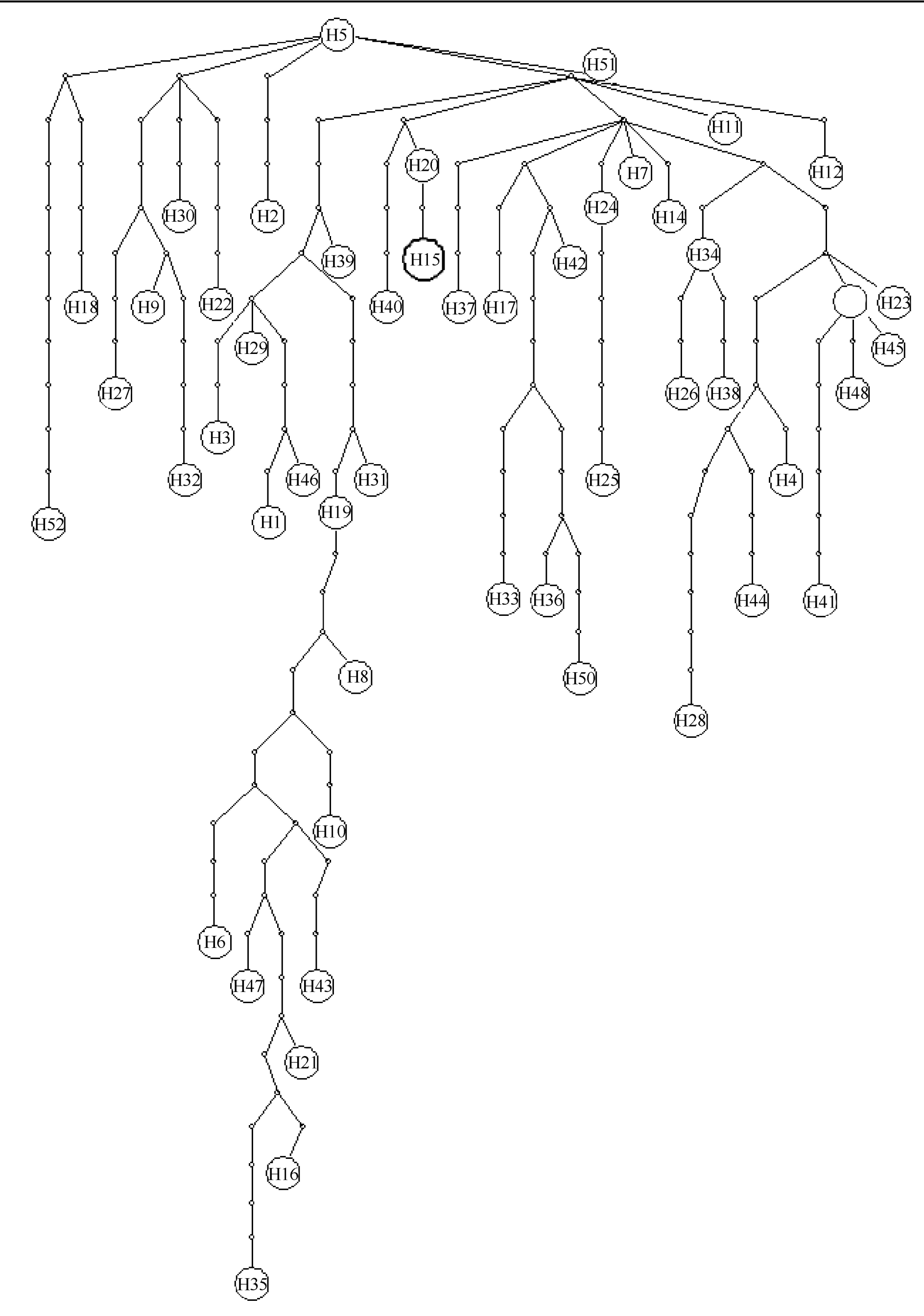


图 2　基于统计简约法构建的单倍型网络图

Fig. 2　Statistical parsimony network of haplotypes

连接单倍型的线表示一步变异；圆圈大小大约表示该单倍型出现的次数。

Each mutational step is shown as a line while the size of circles roughly represents the numbers of individuals.

3　讨　论

遗传多样性(genetic diversity)又称为基因多样性(gene diversity), 通过遗传多样性的研究能从本质上揭示物种多样性的起源、变异和进化。从遗传学和进化角度看, 一个物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关(Jiang et al, 2003)。

2001 年对采自黄海和东海 5 个海区的 48 个个体小黄鱼进行随机扩增 DNA 多态性(RAPD), 研究表明, 从 40 个 10 bp 引物中选取 20 个用于群体遗传多样性分析, 共检测出 145 个位点, 其中 132 个(91.03%)显多态性。用 Shannon 多样性指数量化的平均遗传多态度为 1.93(1.50~2.44), 群体内和群体

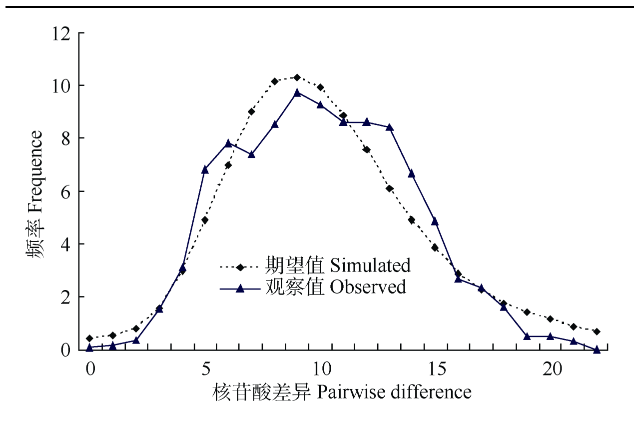


图 3 舟山小黄鱼种群单倍型的不配对分布图
Fig. 3 Mismatch distributions of the haplotypes of *Pseudosciaena polyactis* in Zhoushan

间的遗传变异比例分别为 69%和 31%；群体间的平均遗传相似度和遗传距离分别为 0.9139 和 0.0861(Meng et al, 2003)。这个数据通过横向比较当时 RAPD 检测到的其他海洋鱼类的多态位点百分率发现，小黄鱼比其他一些海洋鱼类，例如梭鱼(*Liza haematocheila*)(Quan et al, 2000)、条纹鲈(*Morone saxatilis*)(Bielawski & Pumo, 1997)、真鲷(*Pagrus major*)(Jiang et al, 2004)的野生或养殖群体都要高。2005 年采用 ISSR 技术对黄海南部小黄鱼群体进行遗传多样性分析，64 条带中具多态性的条带，占 65.63%，群体内的遗传差异达 0.2187, Shannon 多样性值为 0.1888，表明小黄鱼具有丰富的遗传多样性，这与采用 RAPD 方法对小黄鱼群体研究得出的结果一致(Xu et al, 2005)。

表 2 舟山小黄鱼种群的线粒体 DNA D-loop 区各区段的遗传多样性指数
Tab. 2 The index of genetic diversity of each section of mitochondrial DNA D-loop region for *Pseudosciaena polyactis* population in Zhoushan

区段 Section	单倍型数 (*h*)	单倍型多样性 (*hd*)	多态位点 (*S*)	平均核苷酸差异数 (*k*)	核苷酸多样性指数 (*π*)
终止序列区 Termination associated sequence domain (TAS)	37	0.978	29	2.878	0.01645
中央保守区 Central conserved domain (CD)	40	0.983	38	5.152	0.01385
保守序列区 Conserved sequence block domain (CSB)	24	0.874	26	1.708	0.00703

h=Number of Haplotypes; *hd*=Haplotype diversity; *S*=Number of polymorphic sites; *k*=Average number of nucleotide differences; *π*=Nucleotide diversity.

衡量一个种群 mtDNA 的遗传变异有两个重要指标：单倍型间的核苷酸多态性(*π*)和平均遗传距离(Zhou et al, 2006)。通过对长江口九段沙、钱塘江口、舟山等 3 个地点 35 尾刀鲚(*Coilia nasus*)的 mtDNA 控制区全序列的变异和遗传结构研究，结果显示，长江口邻近水域刀鲚的平均单倍型多样性(*hd*)为 0.9983，平均核苷酸多样性(*π*)为 0.0262，表现出丰富的遗传多样性和较高的进化潜力(Yang et al, 2008)。采用聚合酶链式反应(PCR)技术测定分析了闽-粤东族、岱衢族大黄鱼群体 47 个个体的线粒体 DNA 控制区基因序列，结果表明，所有个体的平均单倍型多样性(*hd*)为 0.470，核苷酸多样性(*π*)为 0.00650，群体遗传变异处于较低水平(Mao et al, 2010)。与以上相近水域的刀鲚和大黄鱼种群相比，再结合 Grant & Bowen 综述各种海洋鱼类的线粒体 DNA 单倍型多样性(*hd*)为 0.11~1.00，核苷酸多样性(*π*)为 0.0008~0.0320(Grant & Bowen, 1998)，本研究中，舟山小黄鱼种群从单倍型多样性(*hd*)来看，在所检测的 53 个个体中，除两个个体共享一个单倍型外，其余个体均独占一个单倍型，平均单倍型多样性(*hd*)为 0.9993，核苷酸多样性(*π*=0.01233)，说明舟山小黄鱼种群具有较高的单倍型多样性，但从核苷酸多样性(*π*)来看，发现舟山小黄鱼的遗传多样性只处于中等水平。从其不高的遗传距离更说明了这一结论，小黄鱼的遗传距离值只有 0.012，而根据 Shaklee et al(1982)提出鱼类在属、种和种群三级水平上的遗传距离值分别为 0.90、0.30 和 0.05。这与 2010 年采用线粒体 Cyt*b* 分析了中国近海丹东、营口、舟山、温州和福州 32 尾小黄鱼的遗传变异，共检测到 26 个单倍型，单倍型多样性(*hd*)为 0.984，核苷酸多态性(*π*)为 0.00395，呈现出较高的单倍型多样性和较低的核苷酸多样性(Peng et al, 2010)相一致,本研究的核苷酸多态性(*π*)指数远高于彭博等所测的数据，是因为线粒体 DNA 的 D-loop 区的变异远高于保守的 Cyt*b*。

若核苷酸错配曲线呈现单峰分布，且 Tajima's *D* 值显著偏离中性检验，则群体在过去经受了扩张，反之，群体大小保持稳定(Liu et al, 2009)。本研究中，

小黄鱼线粒体 DNA D-loop 区的单倍型核苷酸不配对分布基本表现出明显的单峰泊松分布，Tajima's *D* 值为−1.84772(P=0.013<0.05)，中性统计检验显著的 Tajima's *D* 值可能是自然选择的作用、群体扩张或瓶颈效应等原因造成的(Tajima, 1989; Zhou & Wang, 2004)，Fu(1997)发现 *Fs* 检验对群体扩张非常敏感，群体扩张通常产生绝对值较大的负的 *Fs* 值，小黄鱼种群的 Fu's *Fs*=−24.49575(P=0.000<0.05)，这说明小黄鱼群体确实经历了群体扩张。通过计算 τ 值我们估计小黄鱼种群扩张时期约在 8.8 万~2.6 万年前，处于更新世晚期(冰河期)。许多研究结果表明，海洋鱼类的种群扩张也大多处于这一时期(Liu et al, 2006; Niu et al, 2011; Yang et al, 2008)。因为第四纪末期的更新世晚期有几次冰期与间冰期旋回，曾引起海平面的升降，现生海洋物种的分布及种群遗传结构大多受到这种冰期旋回的影响。Niu et al(2011)研究认为，更新世后的海平面上升事件对东海鱼类的 mtDNA 遗传结构具有重要影响。本研究中，我们发现小黄鱼种群经过扩张后，只是积累了单倍型多态性，但却还未能积累核苷酸序列的多样性。

通过分析小黄鱼种群的线粒体 DNA D-loop 区各区段的遗传多样性，结果发现小黄鱼种群中终止序列区是整个 D-loop 区变异最多的区段，其次是中央保守区，最保守的是保守序列区。这与大部分文献阐述认为终止序列区是线粒体 DNA D-loop 区中变异最大的部分相一致，但与中央保守区是线粒体 DNA D-loop 区中最为保守的部分存在分歧，不过与本研究相同的是长江口鲚属鱼类 mt DNA D-loop 区中也发现保守区的碱基序列比中央保守区更为保守(Zhu et al, 2008)。因此猜测，保守区和中央保守区谁更为保守，要依据不同物种具体而定。

20 世纪 80 年代中后期小黄鱼鱼汛消失，为保护小黄鱼等经济鱼类，从 1981 年起在小黄鱼的最大产卵场--吕泗渔场实行了休渔规定，东海区小黄鱼资源逐步得到稳定与好转，到 1995 年在东海和黄海全面实行伏季休渔制度，东海区小黄鱼的年渔获量开始出现了持续增加之势，但在强大的捕捞压力下仍显得不足(Lin et al, 2004)。研究表明，对比伏季休渔制度实施前后的渔业资源常规监测资料分析可见，伏季休渔实施前的 1992—1994 年的 7—9 月，小黄鱼的渔获组成主要由当年生幼鱼和 1 龄以上鱼两股群体组成，当龄鱼的幼鱼比例为 43.14%，而伏季休渔制度实施后的 2000 年 7—9 月，小黄鱼的渔获组成绝大多数为当年生幼鱼，其比例高达 74.64%(Chen et al, 2004）。这一现象表明，虽然伏季休渔制度的实施对东海区小黄鱼资源数量的恢复与相对稳定起到了至关重要的作用，但这种作用主要表现为对小黄鱼幼鱼群体的短时间保护，而对其剩余群体的保护作用难以体现。目前小黄鱼的渔获群体利用质量不仅没有因伏季休渔制度而带来根本性的好转，恰恰相反，由于捕捞强度的逐年增加，其群体生物学表征反而进一步表现为严重恶化的趋势(Lin et al, 2004)。结合本研究中舟山小黄鱼种群的遗传多样性只处于中等水平来看，必须采取更科学、更严格的管理措施, 2009 年底，“吕泗渔场小黄鱼银鲳国家级水产种质资源保护区”获准建立，这将为小黄鱼资源的保护和利用提供有利的平台，如此期望小黄鱼资源走向可持续发展的道路。

参考文献：

Agnèse JF, Zentz F, Legros O, Sellos D. 2006. Phylogenetic relationships and phylogeography of the Killifish species of the subgenus *Chromaphyosemion* (Radda, 1971) in West Africa, inferred from mitochondrial DNA sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol,* **40**(2): 332-346.

Bielawski JP, Pumo DE. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic coast striped bass [J]. *Heredity,* **78**(1): 32-40.

Chen JH, Lin LS, Ling JZ, Li JS, Ding FY. 2004. Effects of summer close season and rational utilization on redlip croaker (*Larimichthys polyactis* Bleeker) resource in the East China Sea region [J]. *Chn J Fish Sci,* **11**(6): 554-560. [程家骅, 林龙山, 凌建忠, 李建生, 丁峰元. 2004. 东海区小黄鱼伏季休渔效果及其资源合理利用探讨[J]. 中国水产科学, 11(6): 554-560.]

Chen JJ, Xu ZL, Chen XZ. 2010. The spatial distribution pattern of fishing ground for small yellow croaker in China Seas [J]. *J Fish Chn,* **34**(2): 236-244. [陈佳杰, 徐兆礼, 陈雪忠. 2010. 我国沿海小黄鱼渔场的空间格局 [J]. 水产学报, **34**(2): 236-244.]

Clement M, Posada D, Crandall KA. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies [J]. *Mol Ecol,* **9**(10): 1657-1659.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evol Bioinform Online,* **1**(1): 47-50.

Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. *Genetics,* **147**(2): 915-925.

Grant WS, Bowen BW. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation [J]. *J Hered*, **89**(5): 415-426.

Huang H, Cheng QQ, Huang H. 2010. Recent progress and prospect of small yellow croaker (*Pseudosciaena polyactis* Bleeker) [J]. *Mod Fish Inf,* **25**(9): 9-12. [黄昊, 程起群, 黄昊. 2010. 小黄鱼生物学研究进展[J]. 现代渔业信息, **25**(9): 9-12.]

Jiang SG, Yang HR, Su TF, Gong SY. 2004. Genetic diversity of three geographical populations of *Pagrosomus major* revealed by RAPD analysis [J]. *J Fish Chn,* **28**(3): 334-338. [江世贵, 杨慧荣, 苏天凤, 龚世园. 2004. 3 个不同地理群体真鲷遗传变异的 RAPD 分析 [J]. 水产学报, **28**(3): 334-338.]

Jiang YY, Kong XY, Yu ZN, Zhuang ZM, Jin XS. 2003. Genetic diversity of *Scomberomorus niphonius* in the Yellow Sea revealed by mtDNA D-loop sequence [J]. *J Fish Sci Chn,* **10**(3): 177-183. [姜艳艳, 孔晓瑜, 喻子牛, 庄志猛, 金显仕. 2003. 黄海蓝点马鲛 mtDNA D-loop 序列变异分析 [J]. 中国水产科学, **10**(3): 177-183.]

Jin XS. 1996. Ecology and population dynamics of small yellow croaker (*Pseudosciaena polyactis* bleeker) in the Yellow Sea [J]. *J Fish Sci Chn,* **3**(1): 32-46. [金显仕. 1996. 黄海小黄鱼 (*Pseudosciaena polyactis*) 生态和种群动态的研究 [J]. 中国水产科学, **3**(1): 32-46.]

Kumar S, Tamura K, Nei M. 1994. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers [J]. *Cabios,* **10**(2): 189-191.

Lee WJ, Conroy J, Howell WH, Kocher TD. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions [J]. *J Mol Evol,* **41**(1): 54-66.

Lin LS. 2004. Analysis on extant abundance of small yellow croaker *Pseudosciaena polyactis* in the East China Sea [J]. *Mar Fish,* **26**(1): 18-23. [林龙山. 2004. 东海区小黄鱼现存资源量分析[J]. 海洋渔业, **26**(1): 18-23.]

Lin LS, Chen JH, Ren YP, Ling JZ. 2004. Analysis of population biology of small yellow croaker *Pseudosciaena polyactis* in the East China Sea region [J]. *J Fish Sci Chn,* **11**(4): 333-338. [林龙山, 程家骅, 任一平, 凌建忠. 2004. 东海区小黄鱼种群生物学特性的分析 [J]. 中国水产科学, **11**(4): 333-338.]

Liu JX, Gao TX, Zhuang ZM, Jin XS, Yokogawa K, Zhang YP. 2006. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*) [J]. *Mol Phylogent Evol,* **40**(3): 712-723.

Liu SF, Wu RX, Zhu L, Zhuang ZM. 2010. Complete sequence and gene organization of mitochondrial DNA of the small yellow croaker *Larimichthys polyactis* [J]. *Oceanol Limnol Sin,* **41**(6): 885-894. [柳淑芳, 吴仁协, 朱玲, 庄志猛. 2010. 小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*) 线粒体基因组结构与特征 [J]. 海洋与湖沼, **41**(6): 885-894.]

Liu ZZ, Yang JQ, Wang ZQ, Tang WQ. 2009. Genetic structure and population history of *Beleophthalmus petinirostris* in Yangtze river estuary and its southern adjacent regions [J]. *Zool Res,* **30**(1): 1-10. [刘至治, 杨金权, 王正琦, 唐文乔. 2009. 长江口及其南部邻近地区大弹涂鱼种群遗传结构及种群历史分析[J]. 动物学研究, **30**(1): 1-10.]

Meng ZN, Zhuang ZM, Jin XS, Tang QS, Su YQ. 2003. Genetic diversity in small yellow croaker (*Pseudosciaena polyactis*) by RAPD analysis [J]. *Biodivers Sci,* **11**(3): 197-203. [蒙子宁, 庄志猛, 金显仕, 唐启升, 苏永全. 2003. 黄海和东海小黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 生物多样性, **11**(3): 197-203.]

Mao Y, Jiang QF, Zeng HS, Wang J. 2010. Genetic diversity of *Pseudosciaena crocea* (Richardson) based on mitochondrial DNA control region sequences [J]. *J Xiamen Univ:Nat Sci,* **49**(3): 440-444. [毛勇, 蒋秋芬, 曾华嵩, 王军. 2010. 大黄鱼线粒体 DNA 控制区遗传多样性分析[J]. 厦门大学学报:自然科学版, **49**(3): 440-444.]

Niu SF, Su YQ, Wang J, Zhang LY, Zeng HS, Zhang M. 2011. Genetic polymorphism of mitochondrial control region and cyt *b* in *Trachurus japonicus* from Fujian coastal waters [J]. *J Fish Sci Chn,* **18**(1): 66-74. [牛素芳, 苏永全, 王军, 张丽艳, 曾华嵩, 张曼. 2011. 福建近海竹荚鱼线粒体 DNA 控制区和细胞色素 *b* 遗传多态性[J]. 中国水产科学, **18**(1): 66-74.]

Peng B, Zhang Q, Zhao S, Yue XL. 2010. Genetic diversity analysis of Larimichthys polyactis in coastal waters of China based on Cytochrome *b* gene [J]. *Guangdong Agric Sci,* **37**(2): 131-135. [彭博, 章群, 赵爽, 乐小亮. 2010. 中国近海小黄鱼遗传变异的细胞色素 *b* 序列分析 [J]. 广东农业科学, **37**(2): 131-135.]

Quan JX, Dai JX, Shen SD, Deng JY, Zhuang ZM. 2000. Genetic variation analysis of two mullet populations through randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) method [J]. *Acta Oceanol Sin,* **22**(5): 82-87. [权洁霞, 戴继勋, 沈颂东, 邓景耀, 庄志猛. 2000. 梭鱼人工养殖群体与自然群体的随机扩增多态 DNA(RAPD)分析 [J]. 海洋学报, **22**(5): 82-85.]

Rogers AR, Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences [J]. *Mol Biol Evol,* **9**(3): 552-569.

Shaklee JB, Tamaru CS, Waples RS. 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins [J]. *Pac Sci,* **36**(2): 141-157.

Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genet,* **123**(3): 585-595.

Tang QY, Liu HZ, Yang XP, Xiong BX. 2005. Studies on the structure of the mitochondrial DNA control region and Phylogenetic Relationships of the subfamily Botiinae [J]. *Acta Hydrobiol Sin,* **29**(6): 645-653. [唐琼英, 刘焕章, 杨秀平, 熊邦喜. 2005. 沙鳅亚科鱼类线粒体 DNA 控制区结构分析及系统发育关系的研究 [J]. 水生生物学报, **29**(6): 645-653.]

Xia YZ, Sheng Y, Chen YY. 2006. DNA sequence variation in the mitochondrial control region of lenok (*Brachymystax lenok*) populations in China [J]. *Biodivers Sci,* **14**(1): 48-54. [夏颖哲, 盛岩, 陈宜瑜. 2006. 利用线粒体DNA控制区序列分析细鳞鲑种群的遗传结构 [J]. 生物多样性, **14**(1): 48-54.]

Xu GP, Zhong XM, Ding YP, Liu PT, Tang JH, Xu P. 2005. The research on genetic diversity of *Pseudosciaena polyactis* population from the southern part of the Yellow Sea [J]. *Mar Sci,* **29**(11): 34-38. [许广平, 仲霞铭, 丁亚平, 刘培庭, 汤建华, 许璞. 2005. 黄海南部小黄鱼群体遗传多样性研究[J]. 海洋科学, **29**(11): 34-38.]

Yan LP, Hu F, Ling JZ, Li SF. 2006. Study on age and growth of *Larimichthys polyactis* in the East China Sea [J]. *J Ocean Univ Chn,* **36**(1): 95-100. [严利平, 胡芬, 凌建忠, 李圣法. 2006. 东海北部和黄海南部小黄鱼年龄与生长的研究 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, **36**(1): 95-100.]

Yan XL, Tang WQ, Yang JQ. 2009. Population genetic structure of tapertail anchovy (*Coilia mystus*) in coastal waters of southeast China based on mtDNA control region sequences [J]. *Biodivers Sci,* **17**(2): 143-150. [阎雪岚, 唐文乔, 杨金权. 2009. 基于线粒体控制区的序列变异分析中国东南部沿海凤鲚种群遗传结构 [J]. 生物多样性, **17**(2): 143-150.]

Yang JQ, Hu XL, Tang WQ, Lin HD. 2008. mtDNA control region sequence variation and genetic diversity of *Coilia nasus* in Yangtze River estuary and its adjacent waters [J]. *Chn J Zool,* **43**(1): 8-15. [杨金权, 胡雪莲, 唐文乔, 林弘都. 2008. 长江口邻近水域刀鲚的线粒体控制区序列变异与遗传多样性[J]. 动物学杂志, **43**(1): 8-15.]

Zhou H, Li DQ, Zhang YG, Yi XR, Liu Y. 2006. Study on mitochondrial DNA genetic diversity of Tibetan Antelope [J]. *Hereditas,* **28**(3): 299-305. [周慧, 李迪强, 张于光, 易湘蓉, 刘毅. 2006. 藏羚羊 mtDNA D-loop 区遗传多样性研究[J]. 遗传, **28**(3): 299-305.]

Zhou Q, Wang W. 2004. Detecting natural selection at the DNA level [J]. *Zool Res*, **25**(1): 73-80. [周琦, 王文. 2004. DNA 水平自然选择作用的检测 [J]. 动物学研究, **25**(1): 73-80.]

Zhu SH, Yang YC, Shen XQ, Zou JX, Zheng WJ, Yu HW, Huang B. 2006. Phylogenetic relationships of Lutjanus inferred from mitochondrial cytochrome b sequences [J]. *Acta Zool Sin,* **52**(3): 514-521. [朱世华, 杨迎春, 沈锡权, 邹记兴, 郑文娟, 余红卫, 黄勃. 2006. 从细胞色素 b 基因序列探讨笛鲷属的分子系统发生关系 [J]. 动物学报, **52**(3): 514-521.]

Zhu SH, Zheng WJ, Zou JX, Yang YC, Shen XQ. 2007. Mitochondrial DNA control region structure and molecular phylogenetic relationship of carangidae[J]. *Zool Res,* **28**(6): 606-614. [朱世华, 郑文娟, 邹记兴, 杨迎春, 沈锡权. 2007. 鲹科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及系统发育关系[J]. 动物学研究, **28**(6): 606-614.]

Zhu TJ, Yang JQ, Tang WQ. 2008. MtDNA control region sequence structure of the genus Coilia in Yangtze River estuary [J]. *J Shanghai Fish Univ,* **17**(2): 152-157. [诸廷俊, 杨金权, 唐文乔. 2008. 长江口鲚属鱼类线粒体 DNA 控制区结构分析[J]. 上海水产大学学报, **17**(2): 152-157.]